



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ

ВТОР ЦИКЛУС

Нада Митревска

**СЕРОЛОШКА ДЕТЕКЦИЈА И МОЛЕКУЛАРНА ТИПИЗАЦИЈА НА ЕРИТРОЦИТНИ
КЛЕТОЧНИ АНТИГЕНИ**

- стручен специјалистички труд -

Штип, 2020

Комисија за оценка и одбрана

Член 1 / Претседател: Проф. д-р Татјана Рушковска

Член 2 / Проф. д-р Катарина Смилков

Член 3 / Ментор: Проф. д-р Даринка Ѓоргиева Ацкова

Датум на одбрана: 18.09.2020 год.

Датум на промоција:

Благодарност

Упатувам искрена благодарност до мојот ментор, проф. д-р Даринка Ѓоргиева Ацкова, за несебичната и професионална посветеност, корисните дискусии и многубројните совети при изработката на овој труд.

Му благодарам и на моето семејство за постојаната помош, поддршка и разбирање во текот на целата специјализација и при изработката на овој труд.

Благодарност и до професор д-р Невенка Величкова, која ме советуваше да не се откажувам од ова дошколување.

Му благодарам на директорот на Институтот за трансфузиска медицина на РСМ, д-р супспецијалист Седула Усеини, за несебичната поддршката во моето дошколување.

Благодарност и до сите што ме поддржаа во оваа специјализација на стручни студии.

СОДРЖИНА

Апстракт.....	7
Abstract.....	8
1. Вовед.....	9
1. 1. ABO крвногрупен систем.....	11
1. 2. Специфични антигени на крвните групи.....	12
2. Преглед на литература.....	14
2. 1. Антигени и антитела во ABO-системот.....	14
2. 1. 1. Наследување на крвните групи.....	14
2. 1. 2. Антиген H.....	16
2. 1. 3. Ретки крвни групи.....	17
2. 1. 4. Антителата присутни во серумот на луѓето.....	17
2. 1. 5. Анти A и анти B антитела од графт по трансплантација.....	17
2. 1. 6. Клиничко значење на анти A и анти B антителата.....	18
2. 2. Rh-систем.....	18
2. 2. 1. Антигени во Rh-системот.....	19
2. 2. 2. Развој на Rh-антигените.....	20
2. 2. 3. Комплекс Rh.....	20
2. 2. 4. Rhnull.....	22
2. 2. 5. Структура на Rh и RhAG гените.....	22
2. 2. 6. Варијанти на D-антиген.....	23

2. 2. 7. Слаб D-антиген (D weak).....	23
2. 2. 8. Парцијален D-антиген.....	24
2. 2. 9. Фенотип DEL.....	25
2. 2. 10. Антитела од Rh-системот.....	25
2. 2. 11. Алоанти Rh-антитела.....	25
2. 2. 12. Автоанти Rh-антитела.....	25
2. 2. 13. Rh и хемолитичка болест кај новородено.....	26
2. 2. 14. Наследување на Rh-системот.....	26
2. 3. Други крвогрупни системи.....	27
2. 3. 1. Систем Kell.....	27
2. 3. 2. Систем Duffy.....	27
2. 3. 3. Систем Kidd.....	27
2. 3. 4. Систем MNS.....	28
2. 4. Молекуларна типизација во трансфузиската медицина.....	28
2. 4. 1. Методи за молекуларно типизирање на ABO и Rh крвогрупниот систем.....	30
2. 4. 2. Методи за изолација на ДНК.....	31
2. 4. 3. Полимераза верижна реакција (PCR – Polimeraze Chain Reaction).....	32
2. 4. 4. Принцип на PCR.....	33
3. Цел.....	35
4. Материјали и методи.....	36

5. Резултати и дискусија.....	37
5. 1. Презентација на протоколи за серолошка детекција на ABO и Rh што моментално се користат на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје.....	37
5. 1. 1. Одредување ABO и Rh на плочка.....	37
5. 1. 2. Одредување ABO и Rh во епрувета.....	39
5. 1. 3. Одредување на крвните групи од ABO и Rh-системот со гел-картичка.....	41
5. 1. 4. Одредување на крвните групи од ABO и Rh-системот во микроплочи.....	42
5. 1. 5. Одредување Rh-фенотип.....	43
5. 1. 6. Одредување слаб D-антиген (D ^u).....	44
5. 1. 7. Дополнителни постапки за детекција на крвна група од ABO-системот кај проблематични примероци.....	45
5. 1. 7. 1. Определување A или AB крвна подгрупа со метод на апсорпција.....	47
5. 1. 7. 1. 1. Определување A крвна подгрупа.....	47
5. 1. 7. 1. 2. Определување AB крвна подгрупа.....	48
5. 2. Податоци од направени анализи за определување крвна група (ABO систем) и Rh-фактор во Институтот за трансфузиска медицина – Скопје.....	49
6. Заклучок.....	52
7. Користена литература.....	53

Серолошка детекција и молекуларна типизација на еритроцитни клеточни антигени

АПСТРАКТ

Крвната група претставува биолошка особина што останува непроменета во текот на животот. Еритроцитните антигени се класифицирани во крвни групи, од кои најпознати се ABO и Rh, според кои едно лице може да биде крвна група A, B, AB и O, Rh-позитивно или Rh-негативно. Основен јаглехидратен антиген на еритроцитната мембрана е трисахаридот кој се состои од галактоза, фруктоза и N-ацетил галактозамин. Други антигени што се идентификуваат во трансфузиолошките лаборатории се антигени од Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS системот. ABO крвнотипниот систем поседува различни антигени во однос на крвните групи A, B, AB и O на површината на еритроцитната мембрана (антигени) и различни антитела во плазмата. Антигенот D е најважен антиген во Rh-системот. Постојат и одреден број лица со варијанти на антигенот D, таканаречен слаб D (weak), парцијален D и фенотип DEL.

Класичен метод за тестирање антигени и антитела е хемаглутинацијата, но некои негови ограничувања можат да се надминат со примена на молекуларни методи – генотипизација.

Во периодот од јуни до ноември 2019 година, на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје беа обработени 759 примероци од пациенти од СТМ при ЈЗУ. Специјална болница по гинекологија и акушерство „Мајка Тереза“ Чаир. Кај сите примероци се одредени крвните групи и Rh-факторот. Од резултатите од обработените примероци крв, дојдовме до заклучок дека најзастапена крвна група во нашата држава е крвната група A. Потоа според застапеноста следува крвната група O, а поретко застапени се крвните групи B и AB. Во однос на Rh-факторот, најголем дел од населението во Македонија е Rh-позитивно, а поретко Rh-негативно.

Клучни зборови: еритроцитни антигени, антитела, серолошка детекција, молекуларна типизација.

Serological detection and molecular typing of erythrocyte cell antigens

ABSTRACT

The blood group is a biological characteristic that remains unchanged throughout life. Erythrocyte antigens are classified into blood groups, the most prominent of which are ABO and Rh, according to which a person may be a blood group A, B, AB and O, Rh positive or Rh negative. The primary carbohydrate antigen of the erythrocyte membrane is the saccharide which consists of galactose, fructose and N-acetyl galactosamine. Other antigens identified in transfusion labs are antigens from the Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS system. The ABO blood group system possesses different antigens relative to blood groups A, B, AB and O on the surface of the erythrocyte membrane (antigens) and different plasma antibodies. Antigen D is the most important antigen in the Rh system. There are also a number of individuals with variants of antigen D, the so-called weak D (weak), partial D and the DEL phenotype.

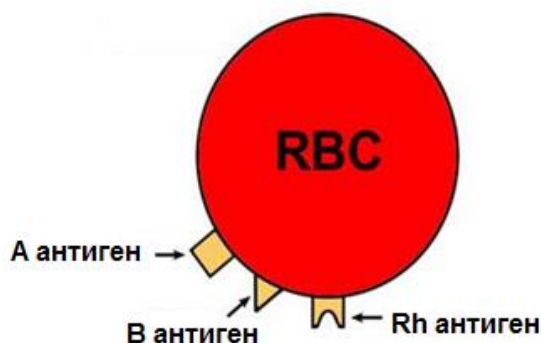
The classic method for testing antigens and antibodies is hemagglutination, but some limitations for application of this method can be overcome by the use of molecular methods - genotyping.

In the period from June to November 2019 at the Institute of Transfusion Medicine - Skopje were processed 759 samples of STM patients from JZU Special Hospital for Gynecology and Obstetrics "Mother Teresa" – Chair. Blood samples and Rh factor were determined in all samples. From the processed blood samples we came to the conclusion that the most prevalent blood type in our country is blood type A. Subsequently, blood group O is represented, and blood groups B and AB are less common. Regarding the Rh factor, most of the population in Macedonia is Rh positive, and rarely Rh negative.

Key words: erythrocyte antigens, antibodies, serological detection, molecular typing.

1. ВОВЕД

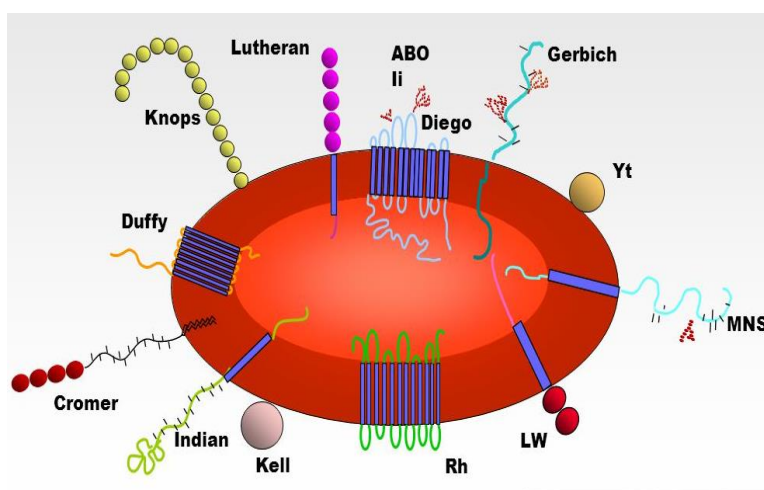
Антигените на крвните групи се полиморфни остатоци од протеини или јаглехидрати на површината на црвените крвни клетки (еритроцити), кои може да предизвикаат одговор од антитела, а некои создадени антитела може да предизвикаат хемолитичка реакција или хемолитичка болест на фетусот или на новороденчето (Sapatnekar, 2015). Кај крводарителите и кај пациентите се детектираат ABO и Rh-антигените, бидејќи се најзначајните антигени при трансфузија (слика 1). Други антигени што ги идентификуваат трансфузиолошките лаборатории се антигени од Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS-системот. Ако е присутно антитело кон клинички значаен антиген, единиците за трансфузија мора дополнително да не го содржат тој антиген (Sapatnekar, 2015).



Слика 1. Антигени на површината на еритроцитот

Фенотипот на еритроцитите е комплетот на антигени на површината на црвените крвни клетки. Во практиката на трансфузиолошките одделенија и лаборатории, овој термин се однесува на статусот на клинички значајните антигени, од ABO и Rh (D) системот, вообичаено некои или сите од следните антигени: C, c и E, e (Rh-системот), K, k (Kell-системот), Fya, Fyb (Duffy-системот), Jka, Jkb (Kidd-систем) (слика 2, табела 1). M, N и S, s (MNS-систем) не се испитуваат во многу трансфузиолошки лаборатории. Тестирањето на фенотипот кај крводарителите и донаторните еритроцитни единици се користи за да се идентификуваат антиген негативни единици за трансфузија, кои вообичаено се

применуваат за пациенти со антитела кон еритроцитите, но понекогаш и за пациенти зависни од трансфузија без антитела, за да се спречи алоимунизација. Тестирањето на фенотипот се изведува со серолошка детекција со специфични антисеруми, со употреба на директна или индиректна (антихуманоглобулинска фаза) хемаглутинација (Sapatnekar, 2015).



Слика 2. Различни еритроцитни фенотипови во зависност од различните антигени на површината

Стандардната серолошка детекција не може да се користи ако пациентот е неодамна трансфундиран, бидејќи донаторните еритроцити може да бидат присутни во циркулацијата до три месеци по трансфузијата. Исто така, стандардното серолошко тестирање не може да се користи за многу антигени ако пациентот има позитивен директен антиглобулински тест (DAT), бидејќи само антигените може да се идентификуваат со директна аглутинација. Посебните серолошки методи може да ги надминат овие ограничувања (Sapatnekar, 2015).

Технологијата базирана на нуклеински киселини, т.е. молекуларната типизација, е широко применувана во полето на трансфузиската медицина. Во трансфузиолошките лаборатории, фенотипизирањето на еритроцитните концентрати обезбедува единици соодветни за сензибилизирани пациенти, односно антиген-негативни единици за пациенти со алоантитела (Hillyer et al., 2008).

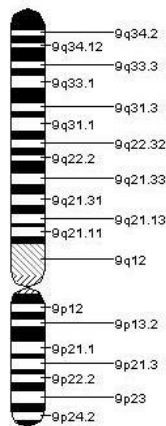
1.1 ABO-систем

ABO-системот на крвни групи е откриен во 1900 година, од австрискиот лекар Карл Ландштајнер, кој воспоставил третман со трансфузија. Хуманиот ген ABO се наоѓа на хромозомот 9 (9q34.1-q34.2) (слика 3). Содржи седум егзони и шест интрони, кои содржат 18 kb геномска ДНК. Секој тип од крвната група ABO е под контрола на еден ген со три алели: I^O , I^A и I^B . Со помош на серолошки методи може да се утврдат шест различни фенотипови: A, B, A_2 , A_2B , AB и O, користејќи анти A и анти B антисеруми (табела 1). Со методите на молекуларната биологија е овозможена и ABO генотипизација. Со методот PCR-SSP се разликуваат главните алели O_1 , O_2 , A_1 , A_2 и B, т.е., 15 различни генотипови (Jukic et al., 2017).

Табела 1: Поважни системи за крвни групи во базата на податоци BGMUT*

Име	Симбол	Број на антигени	Име на генот	Хромозом
ABO	ABO	4	ABO	9
MNS	MNS	43	GYPA, GYPB, GYPE	4
P	P1	1	P1	22
Rhesus	Rh	49	RhD, RhCE	1
Lutheran	LU	20	Lu	19
Kell	KEL	25	KEL	7
Lewis	LE	6	FUT3	19
Duffy	FY	6	FY	1
Kidd	Jk	3	SLC14A1	18

*Blood Group antigen gene MUTation Database



Слика 3. Генска мапа на хромозомот 9

Крвната група претставува биолошка особина што останува непроменета во текот на животот. Според меѓународната асоцијација на трансфузиолози, типот на крвната група се манифестира со околу 30 различни антигени на еритроцитната мембрана. Антигените се класифицирани во крвни групи, од кои најпознати се ABO и Rh, според кои едно лице може да биде крвна група A, B, AB и O, Rh-позитивно или Rh-негативно. Присуството или отсуството на антигени е многу важно при трансфузија на крв и за време на бременост. Мешањето на антигени од некомпатибилна крв може да има трагични последици (Pavelić, 2012).

Луѓето со крвна група O се сметаат за универзални донатори, а луѓето со крвна група AB универзални приматели. RhD позитивен тип е почест од RhD негативен тип (Pavelić, 2012).

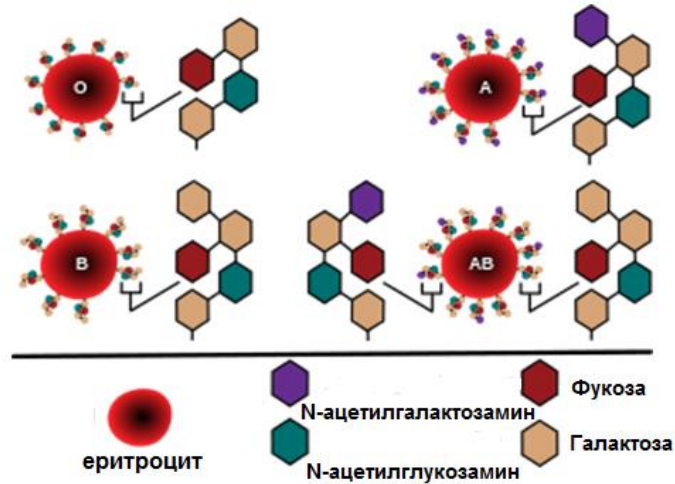
1.2. Специфични антигени на крвните групи

Специфичните антигени на крвните групи претставуваат група на олигосахариди и се означуваат уште и како аглутиногени. Кај некои клетки, тие се поврзани за мембранските протеини во форма на O-гликозиди. Понекогаш, олигосахаридите може да бидат поврзани за мембранските липиди, во форма на гликолипиди. Липидниот дел на молекулата овозможува поврзување на антигенот на надворешната страна на еритроцитните мембрани (Џекова-Стојкова и сор., 1999).

Основен јаглехидратен антиген е трисахаридот, кој се состои од N-ацетил галактозамин, галактоза и фукоза. Оваа структура ја определува припадноста на крвната група O. Речиси сите луѓе имаат способност да го синтетизираат овој олигосахарид. Крвните групи A, B и AB се формираат со додавање на N-ацетил галактозамин (крвна група A) или галактоза (крвна група B), или и двете мономерни единици (крвна група AB) кон основниот олигосахарид (Џекова-Стојкова и сор., 1999) (слика 4).

За синтеза на олигосахаридите од типот A, B или AB, потребни се соодветни ензими. Така, некои индивидуи поседуваат N-ацетил галактозамин трансфераза, со што се синтетизира олигосахарид од типот A и се определува

припадноста на крвната група A. Според тоа, лицата со крвна група B имаат ген за синтеза на галактозил трансфераза, а лицата со крвна група AB поседуваат ген кој кодира синтеза и на двата ензима (Џекова-Стојкова и сор., 1999).



Слика 4. Дијаграм што ги прикажува синцирите на јаглехидрати кои ја одредуваат крвната група според ABO-системот

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

2.1. Антигени и антитела во ABO-системот

ABO крвогрупниот систем поседува различни антигени во однос на крвните групи A, B, AB и O на површината на еритроцитната мембрана (антигени) и различни антитела во плазмата прикажани во табела 2.

Табела 2. Антигени и антитела во ABO крвогрупниот систем

Крвна група	Антигени на површината на еритроцитите	Антитела во плазмата
A	A	Анти-B антитела
B	B	Анти-A антитела
AB	AB	Нема антитела
O	Нема антигени	Анти-A и анти-B антитела

2.1.1. Наследување на крвните групи

Наједноставен пример на мултипли алели кај човекот е генскиот локус за ABO-системот на крвните групи, кој се наоѓа на хромозомот 9. Антигените за ABO-системот се пренесуваат на наредните генерации, според Менделовиот закон, преку три алели (I^A , I^B и I^O) (табела 3). Овие три алели ја одредуваат синтезата на ензимот гликозил трансфераза, кој ја катализира синтезата на полисахаридот A (кај крвната група A) и полисахаридот B (кај крвната група B) (Џекова-Стојкова и сор., 1999).

Табела 3. Наследување на крвните групи од родители на деца.

Родители	Можна крвна група на дете	Крвни групи што не се можни
A, A	A, O	B, AB
A, B	A, B, AB, O	/
A, AB	A, B, AB	O
A, O	A, O	B, AB
B, B	B, O	A, AB
B, AB	A, B, AB	O
B, O	B, O	A, AB
AB, AB	A, B, AB	O
AB, O	A, B	AB, O
O, O	O	A, B, AB

Во табела 4 и 5, прикажана е застапеноста на најчестите крвни групи, изразени во проценти, во определени делови од светот во споредба со нашата држава и дополнително, на светско ниво.

Табела 4: Процентуална застапеност на најчестите крвни групи во одбрани региони од светот (Стефановска и Димитровски, 2004)

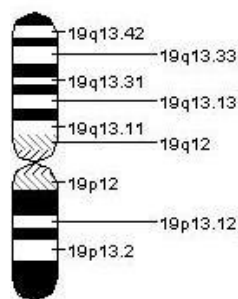
ABO крвни групи	Македонија	Европа	Американски Индијанци	Ескимии
A	41%	30-40%	12%	43%
O	35%	34-50%	88%	53%
B	16%	9-17%	0%	1,5%
AB	8%	3-6,5%	0%	1,5%
Крвна група според Rh-фактор				
Rh-фактор	Македонија	Европа	Кина	
Rh-позитивни	87%	85%	100%	
Rh-негативни	13%	15%	0%	

Табела 5: Застапеност на крвните групи, изразено во проценти, во однос на застапеност кај светската популација

Ранг	Крвна група	Светско население%
1	О позитивна	38,67
2	А позитивна	27,42
3	В позитивна	22,02
4	АВ позитивна	5,88
5	О негативна	2,55
6	А негативна	1,99
7	В негативна	1,11
8	АВ негативна	0,36

2.1.2. Антиген Н

Антигенот Н од Н-системот е високофреквентен антиген. Речиси сите луѓе го поседуваат на еритроцитите и на другите ткива. На долгиот крак на хромозомот 19 се наоѓаат гените Н/н, кои ја контролираат неговата експресија (слика 5). Антигенот Н претставува акцепторен супстрат за А и В трансферазата. На еритроцитите кај луѓето со крвна група О, кои имаат нормален ген Н, се наоѓа само антиген Н, бидејќи во нивниот генотип нема А и В гени, нема ни активна трансфераза што би го искористила антигенот Н како акцепторен супстрат. Затоа количината на антигенот Н на еритроцитите со фенотип О е најголема. Овој антиген во различни количини се наоѓа на еритроцитите и кај луѓето со други крвни групи, но во помала количина, бидејќи со дејство на А и В трансферазата се троши антиген Н. Овој антиген е присутен и во секретите (Gligorović et al, 1998).



Слика 5. Генска мапа на хромозомот 19

2.1.3. Ретки крвни групи

Луѓето со крвна група А најмногу се со фенотип A_1 и A_2 . Многу малку луѓе припаѓаат на подгрупа А, фенотип A_3 , A_x , A_{end} , A_m , A_y и A_{el} . Во рутинските тестирања на еритроцитите се среќава слаба експресија на антиген А и вообичаена или зголемена експресија на антиген Н. Некои луѓе со крвна група В имаат слаб антиген В и се означуваат како подгрупа В со фенотип B_3 , B_x , B_m , B_{el} и B_w (Gligorović et al., 1998).

2.1.4. Антитела присутни во серумот на луѓето

Анти-А и анти-В антителата се речиси секогаш присутни во серумот на возрасните. Отсуството на овие антитела во серумот покажува постоење на слабите подгрупи на А или В, на близначки химер или хипогамаглобинемија. Кај возрасните овие антитела припаѓаат на имуноглобулини од IgM, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgA класа. Генерално, анти-А и анти-В антителата се од IgM-класа, имуноглобулин кој е пентамер и има десет врзувачки места. Кај новородените, до третиот месец од животот, анти-А и анти-В антителата припаѓаат на IgG-класа. Имуноглобулините од IgG-класа претставуваат мала молекула што има две врзувачки места и за да дојде до премостување помеѓу два еритроцита, потребен е ензим или друго антитело што ќе се врзе за IgG-молекулите и ќе овозможи аглутинација. Имуниот систем на новороденото ретко синтетизира антитела од IgM-класа. Анти-А и анти-В антителата во серумот се од мајката, кои преку плацентата поминале во циркулацијата на плодот во текот на интраутериниот живот (Gligorović et al., 1998).

2.1.5. Анти-А и анти-В антитела од графт по трансплантација

Лимфатичното ткиво присутно во органите што се трансплантираат може да произведе свои антитела во организмот на примателот. Доколку трансплантираниот орган (срце, црн дроб, бубрег или панкреас) потекнува од донатор со неидентична крвна група со онаа на примателот, овие антитела можат да ги загрозат еритроцитите на примателот, бидејќи се однесуваат како автоантитела способни да предизвикаат интраваскуларна хемолитичка реакција.

Овие антитела вообичаено се идентификуваат во серумот 7-10 дена по трансплантацијата на органот и често покажуваат склоност да се задржат во циркулацијата околу еден месец. По својот карактер, откриените антитела од трансплантираниот орган најчесто припаѓаат на IgG-класата на имуноглобулини (Gligorović et al., 1998).

2.1.6. Клиничко значење на анти-А и анти-В антителата

Во споредба со останатите крвнотрупни антитела, анти-А и анти-В антителата имаат најголемо клиничко значење за трансфузијата на крв. Тоа се антитела што во најголем број случаи ја носат одговорноста за најтежок облик на хемолитичка трансфузиска реакција (Gligorović et al., 1998).

Овие антитела се одговорни и за настанување на хемолитичка болест на новороденото.

2.2. Rh-систем

Rh-системот е комплексен, полиморфен и многу значаен во клиничката практика. Антигенот D е најважен антиген во Rh-системот и најимуноген по ABO-антигените. Серолошката детекција на полиморфна крвна група, антигените и фенотиповите обезбедува вреден извор на соодветни примероци на крв за проучување и на молекуларно ниво (Rizzo et al., 2012; Guzijan et al., 2019).

Името на овој крвен фактор кај човекот доаѓа од еден вид мајмун (*Macacus rhesus*) во чија крв било утврдено присуство на D-антигени, кои доколку се вбризгаат во зајак, предизвикуваат создавање на антитела. Доколку серумот со антитела D се измеша со човечката Rh крвна група, реакцијата ќе биде позитивна (крвта ќе аглутинира), што се должи на имунолошката реакција меѓу антигените D од човечката крв и антителата D од имунизираната крв на зајакот. До таква реакција нема да дојде само ако човечката крв е Rh-негативна, односно нема антигени D.

На сите дарители на крв и пациенти им се одредува антиген D, кој е составен од мозаик на епитопи. Луѓето се Rh-позитивни или Rh-негативни, но

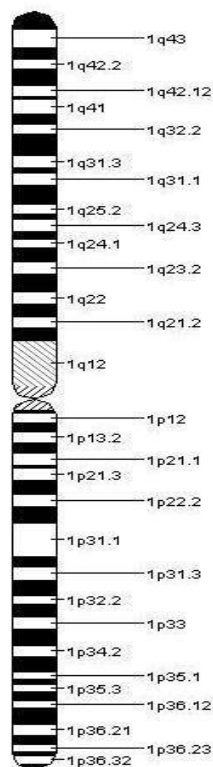
постојат и одреден број лица со варијанти на антиген D, таканаречен слаб D (weak), парцијален D и фенотип DEL.

Rh-позитивни се околу 85% од населението кај белата раса, околу 95% се позитивни Африканците јужно од Сахара и околу 99,5% од населението од источниот дел на Азија. Утврдено е дека 1-2% од луѓето со европско потекло имаат некоја варијанта на антиген D додека кај населението од Африка тој процент е поголем (Guzijan et al., 2019).

2.2.1. Антигени во Rh-системот

Системот Rh се состои од 50 антигени, обележани со ознаки од Rh1 до Rh 57. За генетиката на наследување на антигени од Rh-системот постојат повеќе теории. Денес се знае дека постојат два структурни гена RhD и RhCE. Генот RhD кодира настанување на антиген D, а генот RhCE е одговорен за настанување на антигенот CE во различни комбинации (се, еЕ, Се или CE). Овие два антигена имаат спротивна ориентација на хромозомот, но се идентични во голема мера (околу 97%), а секој се состои од 10 егзони. Антигените од Rh-системот кодираат два гена. Фактот што овие гени се наоѓаат во ист хромозом, близу еден до друг, овозможува размена на материјал меѓу нив и ја објаснува сложеноста на Rh-системот.

Размената на RhD и RhCE доведува до нови полиморфни протеини кои се одговорни за настанување на многу антигени што припаѓаат на Rh-системот. Гените што ги контролираат антигените од Rh-системот се сместени на првиот хромозом на кусиот крак 1p36.13-p34.3. Овој хромозом е метацентричен (Guzijan et al., 2019) (слика 6).



Слика 6. Генска мапа на хромозом 1

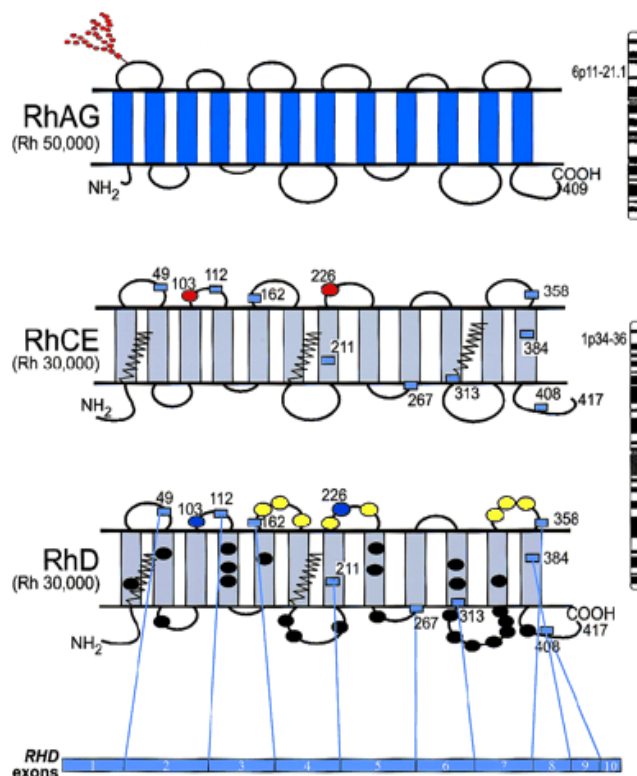
2.2.2. Развој на Rh-антигените

Антигените од Rh-системот, кои се наоѓаат само на површината на еритроцитите, се појавуваат уште во раната фаза на феталниот живот, и тоа помеѓу 8 и 12 недела од интраутериниот живот (Gligorović et al., 1998).

2.2.3. Комплекс Rh

Rh-протеините носат Rh-антигени кои се изразени само на површината на еритроцитите ако е присутен и RhAG. Хомологијата на аминокиселинската секвенција на Rh и RhAG укажува на врската меѓу нив и тие се нарекуваат уште и „семејство на Rh-протеини“. Профилите на хидрофобноста, имунохемиските анализи и податоците добиени преку мутагенезата насочена кон локацијата Rh и RhAG, покажуваат дека овие протеини имаат 12 трансмембрански споеви со N-завршеток и C-терминален крај ориентиран кон цитоплазмата. Составот на

комплексот е непознат, но се смета дека е тетрамер што се состои од две молекули на Rh асоциран гликопротеин (RhAG) и две молекули на Rh-протеин (Avent and Reid, 2000) (слика 7).



Слика 7. Модел на топологија за RhAG, RhCE и RhD.

Во RhD и RhCE протеините се разликуваат од 31 до 35 аминокиселини, во зависност од RhCE-алелот. Гликопротеинот на RhAG е 40% идентичен со RhD и RhCE протеините, што укажува на тоа дека тој припаѓа на семејството Rh-протеини и како и RhD и RhCE протеините ја преминува еритроцитната мембрана. Rh-протеинското семејство е составено од клучниот Rh-протеин на еритроцитите носители на антигени D, C (или c), E (или e) и Rh асоциран гликопротеин RhAG. Десетици дополнителни гликопротеини се поврзани со семејството Rh. Разновидностите на антигенските протеини на Rh-системот се асоцирани со губење на поединечни нуклеотиди, единечни нуклеотидни замени во синџирот на ДНК, транслокација, промени во изразувањето на антигените, итн. (Flegel, 2007).

2.2.4. Rhnull

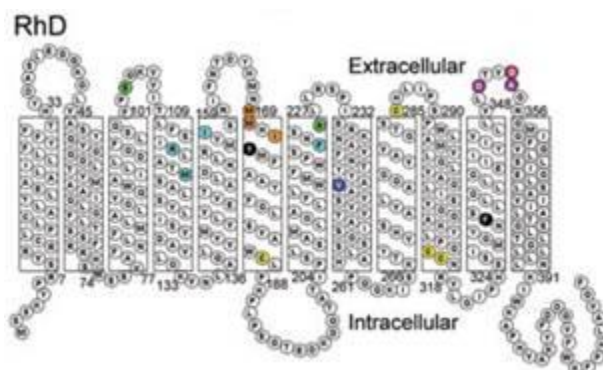
RhAG-гликопротеинот е потребен за изразување на RhD и RhCE протеините во еритроцитната мембрана. Во отсуство на RhAG-протеин се нарушува собирањето и трансферот на клучните Rh комплексни протеини, Rh и RhCE протеините од цитоплазмата до еритроцитната мембрана. Ова е потврдено со еден од фенотиповите на Rh-системот, фенотип на Rheshnuen (Rhnull). Rhnull-фенотип може да се должи и на мутација на еден од гените на голем комплекс на Rh-генот, генот RhAG, кој го блокира формирањето на RhAG асоцираниот гликопротеин. Поединците од Rhnull можат да ги пренесат антигените на семејството резус на своите деца (Flegel, 2007).

Постојат два типа на Rhnull, аморфен и регулаторен, кои историски се класифицирани врз основа на нивниот модел на наследување. Аморфниот тип е резултат на молекуларната промена во RhCE, додека регулаторниот тип е поврзан со молекуларен дефект во RhAG. Еритроцитите од луѓето кои имаат Rhnull фенотип немаат Rh-протеини и, според тоа, немаат и Rh-антигени. Овој фенотип е редок. Rhnull еритроцитите може да имаат скратено *in vivo* преживување, а лицето може да има блага хемолитичка анемија (Avent and Reid, 2000).

2.2.5. Структура на Rh и RhAG гените

Гените што кодираат RhD и RhCcEe се високохомологни, додека генот што кодира RhAG е речиси 40% хомологен. Трите гени се составени од 10 егзони, RhCE и RhD опфаќаат 69 килобази (kb) од ДНК, додека RhAG опфаќа 32 kb. RhD и RhCE протеините се 92% идентични во структурата (аминокиселински состав и конформација) поради високата хомологија на RhD и RhCE гените што ги кодираат. Двата протеина се составени од 416 аминокиселини и се разликуваат само во 35 аминокиселини (слика 8). Мембраната на една црвена клетка содржи од 10 до 30 илјади молекули на клучните Rh-антигени. RhD-протеините и RhCE се молекули кои ја преминуваат еритроцитната мембрана 12 пати во насока од внатрешната површина до надворешната површина, а потоа се враќаат во

внатрешната со C и N терминалните краеви ориентирани кон цитоплазмата (Flegel, 2007).



Слика 8. Структурна организација на RhD-протеинот

2.2.6. Варијанти на D-антиген

Намалената експресија на D-антигенот се јавува кај околу 0,2 – 1% од белата раса. Историски гледано, антигените на еритроцитите што реагираат со анти-D само по продолжено тестирање со индиректен антихуманоглобулински тест се нарекуваат „слаби D“ антигени. Слабата D експресија првенствено произлегува од единечни мутации во RhD што кодираат промени во аминокиселините кои се предвидени да бидат интрацелуларни или во мембранските региони на RhD. Некои делумно D-антигени, слични на слабите D се резултат на точкестите мутации во RhD кои предизвикуваат промени на една аминокиселина. Но за разлика од слабите D, овие промени се наоѓаат на екстрацелуларните региони и се менуваат или создаваат нови епитопи (Rizzo et al., 2012).

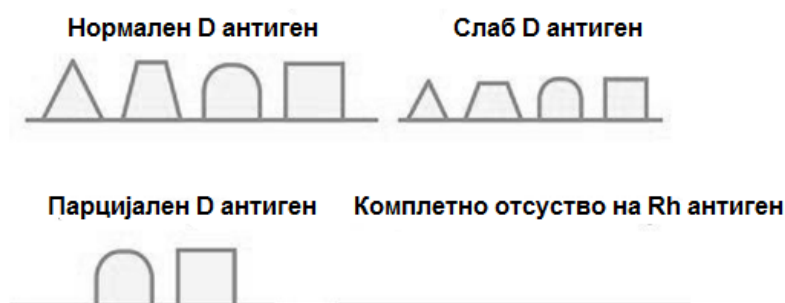
2.2.7. Слаб D-антиген (D weak)

Терминот D weak (слаб D) подразбира комплетен антиген D, кој ги има сите епитопи, но се слабо изразени. Многу години се сметало дека раздвојувањето на фенотипот D weak од парцијалниот D има значење за клиничката практика, затоа што луѓето со фенотип D weak нема да создадат анти D антитело ако примат D

позитивна крв, бидејќи нивниот D-антиген, иако слаб, е со нормална градба (Guzijan et al., 2019).

Делумно, D може да произведе различен израз на протеински епитоп и да предизвика специфично производство на антитела. Во оваа ситуација, делумните D субјекти треба да се сметаат за Rh-негативни и да бидат трансфундирани со Rh-негативни црвени крвни клетки (Guzijan et al., 2019).

Оваа варијанта на D-антиген се разликува само по бројот на антигенски места на површината на еритроцитите (Gligorović et al., 1998) (слика 9).



Слика 9. Варијанти на D-антиген

2.2.8. Парцијален D-антиген

Кај парцијалниот D-антиген има недостаток на делови од антигенската структура, т.е. антигенскиот епитоп (Gligorović et al., 1996).

Луѓето со парцијален D може да создадат анти-D антитело по примање на D позитивна крв против делот на антиген D кој им недостига, па затоа треба да се трансфундираат само со D негативна крв (Guzijan et al., 2019).

Таканаречените парцијални RhD фенотипови добиле ознаки како што се DIIIa, DVI, DBT и DFR. Тие ознаки меѓусебно можат да се раздвојат, како со серолошки така и со молекуларни техники (Guzijan et al., 2019).

2.2.9. Фенотип DEL

Многу слабо изразениот D-антиген се нарекува DEL, затоа што може да се детектира само со елуција. Сите алели на DEL се ретки во Европа, но во Источна Азија и до 30% од D негативните лица се носители на DEL-алелите (Flegel, 2007).

2.2.10. Антитела од Rh-системот

Клиничкиот човечки RhD-антиген е најважниот протеин на мембраната на црвените крвни клетки во трансфузиската медицина. Алоимуната реакција против RhD произведува високоафинитетни IgG-антитела што предизвикуваат хемолитички реакции и хемолитичка болест на новороденото. Профилактичката употреба на RhD имун глобулин кај бремени RhD негативни жени е голем напредок во спречувањето на хемолитичка болест на новороденото (Chang and Siegel, 1998).

2.2.11. Алоанти Rh-антитела

Антителата специфични за Rh се сметаат за типични алоимуни антитела што настануваат како резултат на синтеза при трансфузија со еритроцити или во текот на бременоста со Rh⁺ плод кај Rh⁻ мајка. Од сите имуни антитела од Rh-системот, најчести се анти-D, а потоа следуваат анти-c, анти-E. Анти-D во најголем број случаи се последица од имунизација во бременост, а не од трансфузија. Антителата од Rh-системот ги поседуваат сите биолошки карактеристики на имуните антитела. Може да припаѓаат на сите класи на имуноглобулини, но класата G доминира. IgG₁ е најчеста откриена поткласа на анти-D. Сите антитела специфични за Rh, анти-D, анти-C, анти-E, анти-c и анти-e можат делумно да припаѓаат на имуноглобулините од класа M. Заедничка карактеристика на сите антитела специфични за Rh-системот е дека не го врзуваат комплементот (Gligorović et al., 1998).

2.2.12. Автоанти Rh-антитела

Топлите автоантитела што се јавуваат во серумот на болните со автоимуна хемолитичка анемија многу често покажуваат антигенска специфичност на некој

од антигените од Rh-системот. Најчести од сите антитела се автоантите, а поретки се автоанти c, E, D и C. Антителата од Rh-системот се имуни антитела и реагираат на температура од 37°C (Gligorović et al., 1998).

2.2.13. Rh и хемолитичка болест кај новородено

Хемолитичката болест кај новороденото е предизвикана од мајчините IgG-антитела кои ја преминуваат плацентата, врзувајќи се за позитивните еритроцити на феталните антигени и иницирајќи нивно уништување, а со тоа предизвикуваат и анемија. Пред употреба на профилактичен Rh-имуноглобулин, анти-D често предизвикуваат фетални оштетувања на мозокот поради зголемено ниво на билирубин (*kernicterus*), па дури и смрт (еритробластозис феталис). И покрај широкораспространетата употреба на профилактичен Rh-имуноглобулин, значителен број жени сè уште се алоимунизирани за време на бременоста од различни причини, вклучувајќи и неупотреба на Rh-имуноглобулин, непризнаен абортус, истекување на феталните еритроцити во циркулацијата на мајката кон крајот на бременоста, итн. (Avent and Reid, 2000).

2.2.14. Наследување на Rh-системот

Rh-системот се наследува од родителите, независно од алелите на ABO крвнот групниот систем. Постојат два различни алела за Rh-факторот: Rh-позитивен и Rh-негативен. Околу 85% од популацијата се Rh-позитивни, а 15% се Rh-негативни. Ако двата родители се Rh-позитивни, зависно од тоа дали се хомо- или хетерозиготи, децата ќе бидат Rh-позитивни или Rh-негативни. Ако двата родители се Rh-негативни, сите деца ќе бидат Rh-негативни. Rh-системот на крвните групи одредува ген што формира два алела: доминантен (D) и рецесивен. Доминантниот алел ја одредува синтезата на антигенот D, така што луѓето со овој антиген се Rh-позитивни. Рецесивниот алел е нефункционален и антигенот D не е создаден, а луѓето се Rh-негативни. Доминантниот алел, исто така, се изразува во хомозиготна и хетерозиготна состојба. Rh-позитивните луѓе може да имаат два генотипа DD (хомозиготна) или Dd (хетерозиготна). Со други зборови, доволно е едно лице да има само еден доминантен алел за да се создаде антигенот D и Rh

да биде позитивен. Луѓето што се Rh-негативни се секогаш рецесивни хомозиготи (dd) (Chang and Siegel, 1998).

2.3. Други крвнотрупни системи

2.3.1. Систем Kell

Антигените од Kell-системот се присутни само на еритроцитната мембрана, со мала густина на антигенски места. Продукцијата на антигените од Kell-системот настанува со дејство на генот на Kell-локусот кој е сместен на хромозомот 7. Постојат најмалку четири пара алелни гени (Gligorović et al., 1998).

Сите антитела специфични за Kell настануваат како последица на имунизација со трансфузија и во бременост. Секое откриено антитело припаѓа на IgG-класа. Со оглед на големиот број регистрирани случаи на тешка хемолитичка трансфузиска реакција и фатален исход, може да се заклучи дека антителата специфични за Kell-системот имаат важно клиничко значење. Поради клиничкото значење, се препорачува трансфузија на еритроцити со фенотип Kell-негативен на сите жени што се во генеративен период од животот (Gligorović et al., 1998).

2.3.2. Систем Duffy

Антигените од системот Duffy се докажани само на еритроцитите, и тоа уште во раната фаза на феталниот живот, а нивниот развој во потполност завршува со раѓањето. Антигените од системот Duffy настануваат како резултат на дејството на два генски алела на локусот Duffy сместен на хромозот 1 и се кодоминантни алели. Специфичните антитела од системот Duffy се јавуваат како последица на имунизација со трансфузија на еритроцити и во бременоста. Овие антитела припаѓаат на IgG-класа (Gligorović et al., 1998).

2.3.3. Систем Kidd

Развојот на антигените од системот Kidd е завршен со раѓањето, а неговите антигени можат да се докажат и на еритроцитите на фетусот стар 7 недели. Присуството на овој антиген е откриен само на еритроцитите. Антигените од Kidd-системот се производ на два генски алела на локусот Kidd сместен на хромозомот

18. Алоантителата специфични за Kidd настануваат како последица на имунизација со трансфузија. Овие антитела припаѓаат на IgG-класа. Во некои случаи може да се најдат и IgM. Специфичните антитела од Kidd може да се јават и како автоантитела во серумот на болни од автоимуна хемолитичка анемија (Gligorović et al., 1998).

2.3.4. Систем MNS

Антигените од MNS-системот се откриени на еритроцитите. Антигените од MNS-системот се лоцирани на хромозомот 4. Антителата M се најчести антитела од MNS-системот. Тие се природни антитела и припаѓаат на IgM-класа. Алоанти M антителата се клинички значајни антитела.

Анти-N антителата се исто така природни антитела, кои реагираат на температура пониска од 37°C. Овие антитела не се клинички значајни антитела.

Анти-S антителата се појавуваат како алоантитела, автоантитела и како природни антитела. Тие се клинички позначајни од анти-M и анти-N антителата, бидејќи предизвикуваат хемолитичка трансфузиска реакција и хемолитичка болест на новороденото кога се наоѓаат во серумот на имунизирана мајка. Припаѓаат на IgG-класа (Gligorović et al., 1998).

Има и други крвнотрупни системи, како што се Luteran, Lewis, Diego, Colton итн., со или без некое важно клиничко значење.

2.4. Молекуларна типизација во трансфузиската медицина

Тестовите базирани на ДНК се користат сè повеќе, за да се утврди фенотипот на крвната група важен при трансфузијата со еритроцити. Класичен метод за тестирање на антигени и антитела е хемаглутинацијата, но некои ограничувања можат да се надминат со тестирање на ДНК. Познавањето на молекуларните основи поврзани со многуте антигени на крвните групи и фенотипови овозможуваат да се предвиди присуство или отсуство на антигените на крвните групи и со тоа да се надминат долгогодишните ограничувања на хемаглутинацијата како метод (Reid, 2009).

Генотипизацијата е од огромно значење, особено за пациенти на кои им е потребна долготрајна повторувачка трансфузија со обезбедување еритроцитни компоненти засновани на совпаѓањето со ДНК на донаторот. ДНК-анализата за типовите ABO и Rh може да биде од значење за решавање на одредувањето на ABO и D. Генотипизирањето на ABO исто така може да биде корисно за разликување на стекнат од наследен фенотип. Многу Rh-фенотипови не можат да се дефинираат со хемаглутинација, па затоа тестовите базирани на полимераза верижна реакција (PCR) се корисни за да се дефинираат некои варијанти на Rh (Reid, 2009).

За да се применат молекуларните техники во клинички ситуации, потребно е да се познаваат основите молекуларни техники, генската структура и обработката на примероците, молекуларните основи на крвните групи, техниките на хемаглутинација, изразување на антигените на крвни групи, факторите што можат да влијаат на толкување на фенотипот (на пример постоењето на химери) (Reid, 2009).

Постојат и дополнителни придобивки од генотипизирањето при определување на крвните групи во подобрувањето на квалитетот на трансфузијата, бидејќи можат да се појават RhD-алели и кај Rh-негативни донатори на крв што може да се искористат за производство на реагенси за црвени крвни клетки (Denomme, 2013).

Во последните години, молекуларните генетски методи засновани врз ДНК, ја подобруваат трансфузиската терапија за пациентите со многу болести меѓу кои, на пример, српеста анемија, бидејќи можат да се добијат единици крв со идентификувана ДНК, за да се обезбеди компатибилна крв за пациентите, што ќе спречи евентуална можна имунизација на пациентот (Cobianchi Da Costa et al., 2013).

Генотипизацијата на крвните групи користејќи ДНК извлечена од фетусното ткиво е корисна за да се идентификуваат фетусите со ризик за развој на хемолитичка болест на фетусот и на новороденото поради алоантителата на

црвените крвни клетки кај мајката. Генотипизацијата за RhD на фетусот бара чиста ДНК на фетусот, изолирана од амниоцитите (Denomme and Fernandes, 2007).

Дополнително на серолошката идентификација, пациентите со слаб D-антиген (D weak) се испитуваат и на молекуларно ниво. Субјектите со слаб D кои припаѓаат на слабиот тип 1, 2, 3, 4,0 и 5 можат да се третираат како Rh-позитивни и да бидат трансфундирани со Rh-позитивни црвени крвни клетки, додека субјектите со слаб тип 4,2, 11 и 15 треба да бидат третирани како Rh-негативни и трансфундирани со Rh-негативни црвени крвни клетки (Rizzo et al., 2012). Во суштина, фенотипот D weak тип 4,2 функционално е идентичен со парцијалниот антиген DAR, а опишано е и дека еритроцитите од овие фенотипови доведуваат до создавање на анти-D антитела кај примателите (Guzijian et al., 2019).

2.4.1. Методи за молекуларно типизирање на ABO и Rh крвногрупниот систем

Денес, повеќето полиморфизми што ги засегаат гените кои ги кодираат еритроцитните антигени се познати и на алелно ниво.

Ова овозможува развој на ДНК-базирани молекуларни техники за утврдување на соодветниот антигенски фенотип, особено важно во случајот на ретките крвни групи (Jungbauer, 2009). Одлуката за тоа која одредена анализа или техничка платформа ќе се користи за генотипизација и точноста на добиените резултати може да бидат под влијание на следниве фактори:

- примарната цел и посебните услови што треба да ги исполнува,
- генетска сложеност на локусот и бројот на алели или генотипови што треба да бидат детектирани со анализата,
- нивото на познавање на вклучените алели и нивната дистрибуција во одредена популација,

- техничките аспекти во врска со изведувањето на анализата, како и специфичноста на методот.

Точноста на резултатите од генотипизацијата се потпира на збир од генетски (на пр. комплексноста на генот, експресијата на гените или нивната супресија), структурни и механистички (на пр., број на вклучени алели, хомологни гени, повторувачки мотиви, соодветно место за врзување за прајмери) и други фактори (на пр., помалку истражувани популации, преваленција на алелите, итн.) (Jungbauer, 2009).

Оттука, постојат многу различни методи, вклучувајќи ги и конвенционалниот PCR и PCR во реално време (real-time PCR), кои се соодветни за оваа апликација. Оваа технологија заснована на нуклеинските киселини сега е во момент кога има сè поголема примена во полето на трансфузиската медицина. Во донаторските крводарителски центри, генотипизацијата на еритроцитните препарати обезбедува производи приспособени на фенотипот за специјалните популации на пациенти или пак антиген-негативни препарати за пациентите со алоантитела.

Во референтните имунохематолошки лаборатории, молекуларните технологии помагаат при детекцијата на крвни групи, особено во ситуација каде што се работи за ретки крвни групи, и ги подобруваат реагенсите што се користат за тестирање во предтрансфузија. Во клиничките центри за трансфузија, генотипизацијата помага за обезбедување еритроцитни препарати приспособени на фенотипот на пациентот. Кај пренаталните тестирања, генотипизацијата помага при одлуката за профилатична апликација на глобулини и во предвидувањето на ризикот од хемолитичко заболување на фетусот и на новороденчето (Hillyer et al., 2008).

2.4.2. Методи за изолација на ДНК

Постојат повеќе методи што можат да се користат за изолација на ДНК од различни биолошки материјали, како на пример полна крв, различни видови ткива, плунка, парафински обложени ткива фиксирани со формалин и сл.

Екстракцијата на ДНК од клетките се изведува по нивното разорување, а се заснова на различните карактеристики што ги имаат ДНК, протеините и останатите конституенси на клетката.

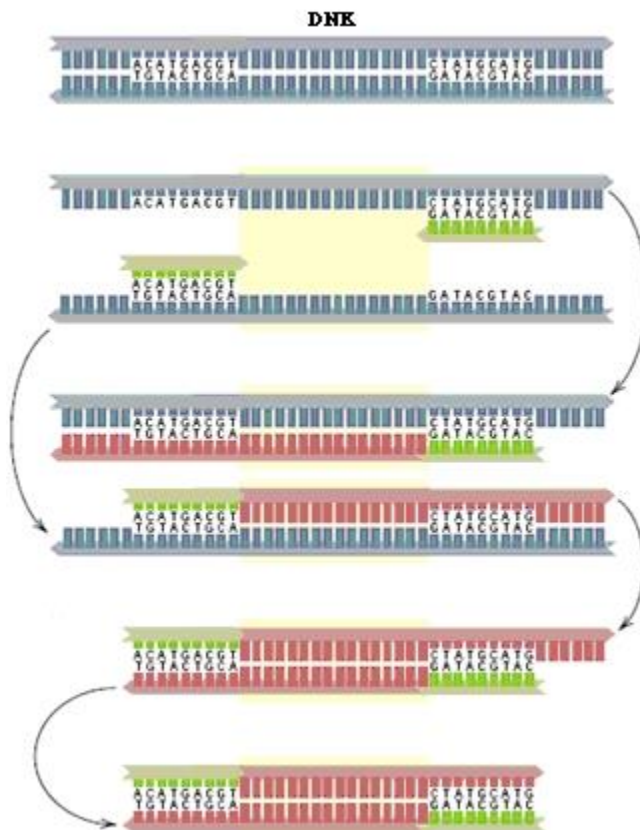
Стандардната постапка се одвива преку дигестија на клетките со протеиназа во присуство на метален хелатор (ЕДТА) и детергент како SDS (натриум додецил сулфат), по што следува течно-течна екстракција на растворот на ДНК со фенол и преципитација со алкохол. Со оваа постапка се добива голем принос на ДНК со големина од 100 до 150 kb, која е адекватна за понатамошни анализи како полимераза верижна реакција, секвенционирање, итн.

Новите техники на изолација на ДНК се темелат на цврсто фазна екстракција (SPE-Solid Phase Extraction). Методот употребува колони исполнети со силика (или некоја друга цврста фаза) што селективно ги врзува (адсорбира) нуклеинските киселини, ДНК и РНК во зависност од рН на средината и концентрацијата на солите во пуферот. Овие колони, како и сите пуфери што се потребни за изведување на постапката доаѓаат во облик на комерцијални комплекти, а изолацијата на ДНК се изведува според инструкциите на производителот. Предноста на овие комплекти се состои во тоа што за разлика од стандардната постапка, целиот процес на изолација на ДНК се изведува многу полесно и побрзо, но освен високата цена, недостатоци се и помалиот принос на ДНК и непознавање на точниот состав на пуферите што се вклучени, што го прави потешко справувањето со проблемите, доколку се појават (Chacon-Cortes and Griffiths, 2014).

2.4.3. Полимераза верижна реакција (PCR-Polimerase Chain Reaction)

Полимераза верижната реакција е една од најзначајните и најчесто употребуваните техники во молекуларната биологија, бидејќи овозможува брза и едноставна *in vitro* амплификација (умножување) на ДНК-секвенции од интерес (слика 10). Теоретски, во рок од само неколку часа, од само една ДНК-молекула можат да се добијат милијарда идентични копии од интерес, означени како ампликони. Добиените ампликони понатаму можат да се визуализираат со

стандардни електрофоретски техники (агарозна или полиакриламидна електрофореза) или пак да бидат вклучени во понатамошни анализи, како што се рестрикција со ендонуклеази, секвенционирање, итн.



Слика 10. Шема за PCR-реакција

2.4.4. Принцип на PCR

Полимераза верижната реакција претставува *in vitro* ензимска репликација којашто се одвива во серија инкубациски чекори на различни температури, во точно определени временски интервали. Еден PCR-циклус најчесто се состои од три инкубациски чекори.

1. **Денатурација** на двојноверижните ДНК-молекули на температура од 95°C. На оваа температура доаѓа до раскинување на водородните врски помеѓу комплементарните бази, при што се добиваат едноверижни нишки.

2. **Анилирање** на прајмерите на температура од 50 до 60°C. Прајмерите претставуваат едноверижни олигонуклеотиди (составени од околу 20 нуклеотиди) што комплементарно се врзуваат (хибридизираат) на двата краја на фрагментот од интерес. Едниот т.н. преден прајмер е комплементарен со 3' крајот на горната (+) верига на ДНК, додека другиот, реверзен прајмер е комплементарен со 3' крајот на долната (-) верига од регионот што треба да се амплифицира.

3. **Екстензија** на прајмерите на температура од 72°C. Екстензијата на прајмерите ја врши термостабилната Таг полимераза (оригинално изолирана од *Thermus aquaticus*) со додавање слободни дезоксирибонуклеозидни трифосфати, dNTP (dATP, dGTP, dCTP и dTTP) во продолжение на прајмерите во насока 5'→3'. На тој начин, доаѓа до синтеза на нова верига, комплементарна на веригата на ДНК за којашто се врзани прајмерите.

Продуктите од PCR-амплификацијата се акумулираат експоненцијално во текот на 25-30 циклуси, така што ДНК што е синтетизирана во еден циклус и самата претставува матрица за синтеза на нова ДНК во наредниот циклус (Матевска и Грозданова, 2010).

3. ЦЕЛ

Преку користење на научни податоци црпени од базите на научни трудови и од сопствените набљудувања и искуства поврзани со извршувањето на редовните работни обврски на кандидатката на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје, може да се:

- направи компарација меѓу различните тестови за серолошка дијагностика на еритроцитни антигени;
- утврдат предностите и/или недостатоците од употребата на молекуларната и серолошката типизација на еритроцитни антигени;
- презентира начинот на работа во реални услови;
- дадат соодветни препораки со клиничко значење за оваа проблематика.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Ова истражување е поткрепено со податоци од достапна научна литература – современи учебници и научни трудови достапни во базите на Google Scholar, PubMed, EMBASE и MEDLINE.

Во трудот се вклучени сопствени резултати од работата на кандидатката на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје. Во периодот од јуни до ноември 2019 година, на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје, обработени се 759 примероци од пациенти од СТМ при Ј.З.У. Специјална болница по гинекологија и акушерство „Мајка Тереза“ – Чаир. Кај сите примероци се одредени крвните групи и Rh-факторот, прикажани се соодветните протоколи за работа и резултатите се соодветно толкувани.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Одредувањето на крвната група и на Rh-факторот е анализа што секојдневно се извршува во трансфузиолошките лаборатории и тоа задолжително се врши:

- во предоперативна подготовка на пациент
- пред трансфузија на крв
- при дарување на крв
- пред донирање органи за трансплантација
- во текот на бременоста
- пред полагање возачки испит.

5.1. Презентација на протоколи за серолошка детекција на ABO и Rh што моментално се користат на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје

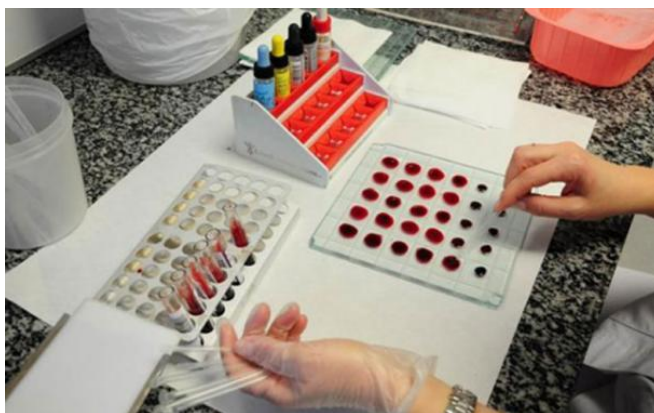
Примероците од крв се земаат во епрувети без антикоагуланс и со антикоагуланс ЕДТА и се користат за серолошки испитувања, а со антикоагуланс ЕДТА може да се искористат и за молекуларни испитувања. За одредување на крвната група и на Rh-факторот се користат имуносеролошки методи. Овие методи може да се изведуваат на плочка, во епрувета, во гел-картички, во микроплочи.

5.1.1. Одредување на ABO и Rh на плочка

Со одредувањето на ABO и Rh на плочка се потврдува присуството или отсуството на антигените на површината на еритроцитите (слика 11). За овој метод ни се потребни тест-серуми анти-A, анти-AB и анти-B за одредување на ABO крвната група и тест-серум анти-D за одредување на Rh-факторот. Секој од тест-серумите е со одредена боја за да се избегнат грешки при нивното капнување врз еритроцитите и во одредувањето на крвната група. Тест-серумот A е со сина боја, тест-серумот AB е безбоен, како и тест-серумот анти-D, додека

серумот анти-В е со жолта боја (слика 12). Тест-серумот анти-А е добиен од плазмата на луѓе со крвна група В, а анти-В тест-серумот е добиен од плазмата на луѓе со крвна група А.





































Постапката за одредување е следната: на чиста и сува плочка се капнува по една капка од тест-серумите, а врз секоја капка се капнува по една капка еритроцити во сопствен серум или плазма. Еритроцитите и серумот се промешуваат со посебно стапче. Внимателно се навалува плочката во траење од околу две минути. Потоа се толкуваат резултатите. Присуството на аглутинација со кој било од серумите значи позитивен резултат (слика 13). Одредувањето на крвната група се одвива во две фази. Во првата фаза, фаза на сензибилизација, антителото се врзува за антигенот и нема видлива аглутинација. Во втората фаза настанува аглутинација и аглутинацијата е видлива.



Слика 11. Метод за одредување на ABO и Rh на плочка



Слика 12. Тест-серуми за одредување антигени на ABO и Rh крвна група
(преземено од www.diamed.com)

BLOOD TYPE	ANTI-A	ANTI-B	ANTI-D	CONTROL
O-POSITIVE				
O-NEGATIVE				
A-POSITIVE				
A-NEGATIVE				
B-POSITIVE				
B-NEGATIVE				
AB-POSITIVE				
AB-NEGATIVE				
INVALID				

Слика 13. Толкување на резултати при одредување крвни групи со метод на аглутинација (преземено од www.pinterest.de)

5.1.2. Одредување на ABO и Rh во епрувета

Епруветата во која има крв за одредување на крвна група и Rh-фактор, со и без антикоагуланс, најпрво се центрифугира за да се одвојат плазмата/серумот и еритроцитите.

Одредувањето на ABO и Rh во епрувета е застарен метод, но во одредени ситуации сè уште се користи. Се изведува во шест епрувети за одредување на ABO и една епрувета за одредување на Rh. Во трите епрувети за одредување ABO антигени се капнува по две капки тест-серуми, и тоа, во првата тест-серум анти-A, во втората тест-серум анти-AB и во третата тест-серум анти-B. Во овие епрувети се додава по една капка еритроцити во сопствен серум/плазма од лицето за кое се одредува крвната група. Во останатите три епрувети за одредување A и B антитела се капнува по една капка познати тест-еритроцити, и тоа во првата O тест-еритроцити, во втората A тест-еритроцити и во третата B тест-еритроцити. Во сите три епрувети се додаваат по две капки серум или

плазма од лицето за кое се одредува крвната група. Во епруветата за одредување на Rh се капнуваат две капки тест-серум анти-D и една капка еритроцити во сопствен серум/плазма од лицето за кое се одредува крвната група. Сите епрувети се центрифугираат на 1 500 вртежи, една минута, и по аглутинацијата што е присутна во епруветите се одредува крвната група. Присуството на аглутинација покажува позитивен резултат, а отсуството – негативен. Аглутинацијата е видлива со лесно протресување на епруветите.

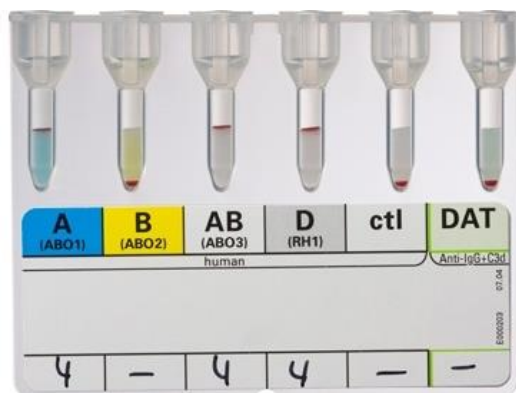
Тест-еритроцитите не се комерцијални, туку се подготвуваат во имунолошката лабораторија, и тоа од еритроцити во сопствен серум/плазма од крвна група А, крвна група В и крвна група О. Во една епрувета се капнуваат еритроцити во сопствен серум/плазма од лица со крвна група О, во друга епрувета се капнуваат еритроцити во сопствен серум/плазма од лица со крвна група А и во трета епрувета еритроцити во сопствен серум/плазма со крвна група В. Овие епрувети се дополнуваат со 0,9% физиолошки раствор. Се центрифугираат. По центрифугирањето се отстранува супернатантот, при што во епруветата остануваат само еритроцити. Ваквата постапка се повторува шестпати. Оваа постапка се нарекува плакнење на еритроцитите, со што се отстрануваат сите хумани глобулини од тест-системот. Потоа се подготвува 3-5% еритроцитна суспензија со додавање на физиолошки раствор.

5.1.3. Одредување на крвните групи од ABO и Rh-системот со гел-картичка

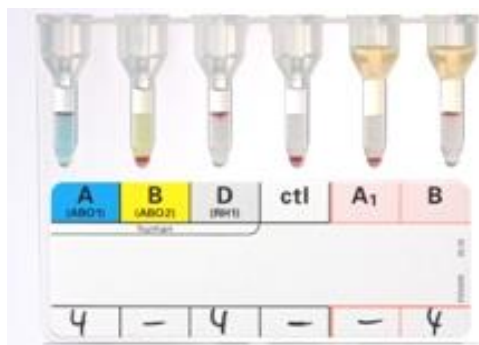
Во овие картички се одредуваат крвните групи од ABO и од Rh-системот. Во гелот на картичките има присуство на тест-серуми анти-A, анти-B и анти-D, со кои се одредува присуството на антигени на површината на еритроцитите и неутрален гел во кој се капнуваат тест-еритроцити A₁ и B, дел во кој се толкува присуството на антитела. Во делот каде што во микроепруветите има тест-серуми се капнува од испитуваната еритроцитна суспензија, а во делот со тест-еритроцити се капнува серум/плазма од лицето за кое се одредува крвната група. Картичката се

центрифугира и резултатите се толкуваат. Доколку настанала аглутинација, аглутинатите не можат да поминат низ гелот и остануваат на површината на микроепруветата, во вид на рамна црта, или се низ гелот (јачина на аглутинација од 1 до 4), што се означува со позитивна реакција. Доколку не настанала аглутинација, еритроцитите на кои не се врзани антитела минуваат низ гелот и во вид на еритроцитен талог (копче) се наоѓаат на дното на микроепруветата, што се означува како негативна реакција (слика 14-16).

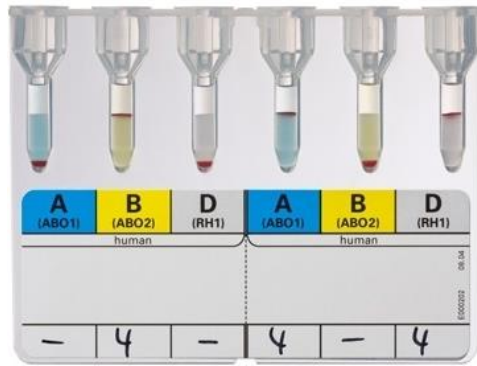
Тест-еритроцитите A₁ и B што се користат во гел-картичките се еритроцитна суспензија 0,8% и се комерцијални, не се подготвени во имунолошката лабораторија при Институтот за трансфузиска медицина – Скопје.



Слика 14. Гел-картичка за одредување крвна група од ABO и Rh-системот на новородени (преземено од www.diamed.com)



Слика 15. Гел-картичка за одредување крвна група од ABO и Rh-системот со присуство на анти-A и анти-B антитела (преземено од www.diamed.com)



Слика 16. Гел-картичка за потврдна крвна група од ABO и Rh-системот
(преземено од www.diamed.com)

5.1.4. Одредување на крвните групи од ABO и Rh-системот во микроплочи

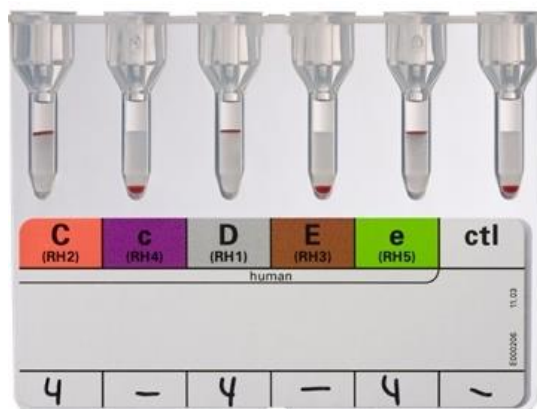
Ова одредување се изведува во апарат групоматик Techno Diamed. Мала количина на тест-серуми се наоѓа во самите плочи, а апаратот, со зададена посебна програма за крвни групи, самиот капнува од комерцијалните тест-еритроцити, плазма и еритроцитна суспензија од пациентите или од дарителите. Потоа следува постапка на центрифугирање, кое се врши во посебна центрифуга (Lyra). По центрифугирањето, автоматски се толкува крвната група од ABO и Rh-системот.

Одредувањето на крвните групи од ABO и Rh-системот на нашиот Институт се изведува и во групоматик Ortho Autovue™ Inova и Ortho vision, во гел-картички од овој производител.

5.1.5. Одредување на Rh-фенотип

Одредувањето на Rh-фенотипот (C, c, E, e) се изведува во гел-картички за фенотип, картички кои содржат тест-серуми анти-C, анти-c, анти-E и анти-e, а во микроепруветата се капнува еритроцитна суспензија од дарителот или од примателот, односно лицето за кое се одредува фенотипот (слика 17). Се центрифугира во посебни центрифуги за овие картички, за време од десет минути, и потоа се толкуваат резултатите. При аглутинација, аглутинатите не поминуваат

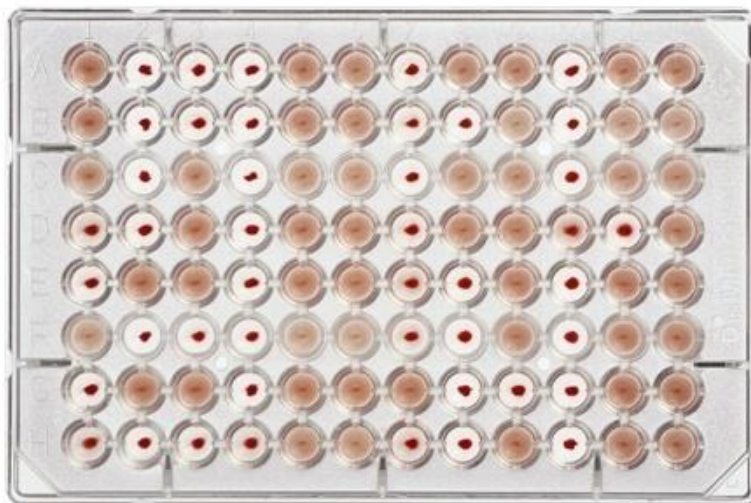
низ гелот и остануваат на површината на микроепруветата во вид на рамна црта што покажува позитивна реакција. Доколку не настанала аглутинација еритроцитите минуваат низ гелот и се спуштаат на дното на микроепруветата во вид на еритроцитен талог (копче) што се означува како негативна реакција.



Слика 17. Гел-картичка за одредување Rh-фенотип (преземено од www.diamed.com)

Исто така, Rh-фенотип може да се одредува и во микроплочи во апаратот групоматик Techno Diamed (слика 18). Во овие плочи има гел тест-серуми за одредување фенотип и автоматски, со одредена програма за фенотип се капнува еритроцитна суспензија од лицето за кое се одредува. Микроплочите се центрифугираат во центрифуга (Lyra) и резултатите се отчитуваат автоматски.

Епруветите од дарителите или од примателите се претходно обележани со бар-кодови. Епруветите содржат антикоагуланс (EDTA) за да не дојде до коагулирање на крвта во епруветата, што ќе доведе до престанување на работата на групоматикот. Пред да се ставаат во апаратот, претходно треба да се центрифугираат.



Слика 18. Микроплоча за одредување крвна група, Rh-фактор и Rh-фенотип
(преземено од www.diamed.com)

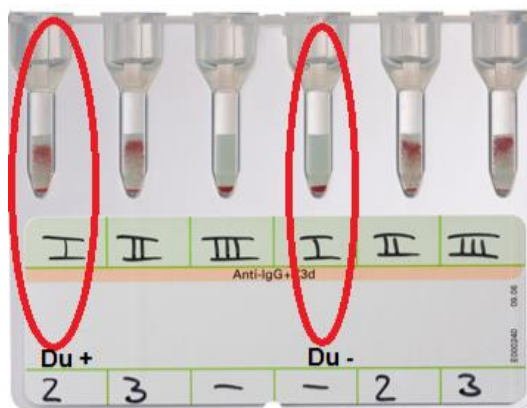
5.1.6. Одредување слаб D-антиген (D^u)

Кај сите Rh-негативни дарители се прават понатамошни испитувања за одредување слаб D-антиген. Одредувањето може да се изведува класично, во епрувета, и во Кумбсови гел-картички. Ова одредување се врши со антихуманоглобулински тест (Кумбсов тест) (слика 19).

Одредувањето во епрувета се изведува на следниот начин: во епрувета се капнуваат две капки анти-D серум, една капка Liss-раствор со ниска јонска јачина и една капка еритроцитна суспензија од дарителот. Се инкубира петнаесет минути на температура од 37°C . По инкубацијата, еритроцитите се плакнат трипати со физиолошки раствор, со цел отстранување на хуманите глобулини од тест-системот, и на крајот се додаваат две капки антихуманоглобулински серум. Епруветата се центрифугира на 1 500 вртежи, една минута. Нежно се протресува и присуството на аглутинација покажува позитивен тест, односно присуство на D-антиген на површината на еритроцитите (D^u позитивен), а отсуството на аглутинација покажува негативна реакција, отсуство на D-антиген (D^u негативен).

Одредувањето на D^u во гел-картичка се изведува на следниот начин: во една од микроепруветите на Кумбсовата картичка се капнува соодветен волумен

на еритроцитна суспензија од дарителот и соодветен волумен тест-серум анти-D. Се инкубира петнаесет минути на температура од 37°C. По инкубацијата, се центрифугира десет минути и резултатот се толкува. Ако еритроцитите не можат да поминат низ гелот, остануваат на површината на микроепруветата, во вид на рамна линија, или се расеани низ гелот, што покажува присуство на слаб D-антиген (D^u позитивен); ако, пак, се на дното на микроепруветата, во вид на еритроцитно копче, тоа покажува отсуство на слаб D-антиген (D^u негативен).



Слика 19. Одредување на слаб D-антиген во Кумбсова гел-картичка (преземено од www.diamed.com)

5.1.7. Дополнителни постапки за детекција на крвна група од АВО-системот кај проблематични примероци

При одредувањето на крвните групи од АВО-системот, може да се соочиме со проблеми, како во одредувањето на антигените така и во одредувањето на антителата. За комплетно да се одреди крвната група, постојат посебни постапки за детекција кај проблематични примероци.

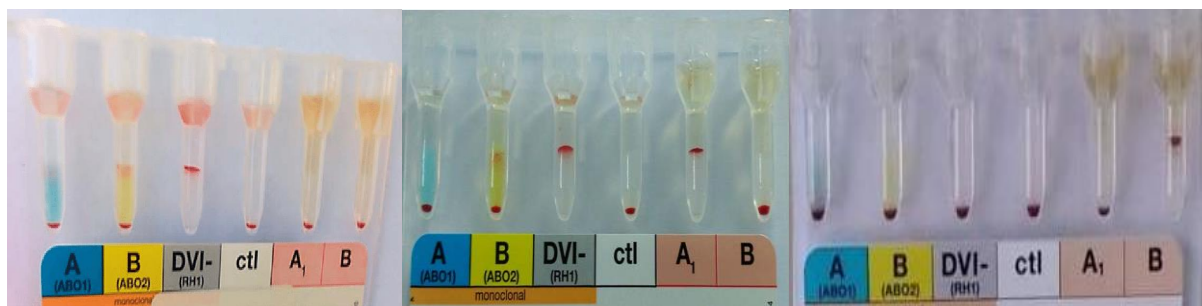
Ако во крвната група не се присутни антитела, тогаш епруветата или гел-картичката во која претходно има капнато соодветен однос на тест-еритроцити и серум од личноста за која се одредува крвната група, ја оставаме во фрижидер на 4°C, еден час, и потоа се центрифугира. Ако за еден час се појават антителата, тоа значи дека постојат студени анти-А или анти-В антитела (слика 20).



Слика 20. Определување крвна група во примероци каде што не се присутни антитела

Ако во делот за детекција на антителата има двојна популација, тогаш гел-картичката се става во термостат на 37°C, еден час. По инкубацијата, картичката се центрифугира и ако се изгуби двојната популација, тоа значи дека личноста за која се одредува крвната група има топли анти-A и анти-B антитела.

Може да се соочиме и со тешкотии при одредувањето на крвните групи (слика 21) и во тој случај користиме дополнителни постапки, а тоа е методот на апсорпција или пак молекуларна типизација.



Слика 21. Приказ на различни случаи каде што се применуваат дополнителни постапки за одредување крвна група кај проблематични примероци

5.1.7.1. Определување на A или AB крвна подгрупа со метод на апсорпција

Целта е да се определи крвната подгрупа од ABO-системот, ако тоа не е можно со стандардните постапки.

Потребен материјал: епрувета со крв од испитаникот, епрувети, пипети, водена бања, центрифуга, анти-ABO серуми, физиолошки раствор.

Постапка: епруветата со примерок крв од испитаникот се центрифугира на 3 000 вртежи, 15 минути. Серумот се издвојува посебно од еритроцитите и еритроцитите се плакнат шестпати со физиолошки раствор. На седиментот, по последното плакнење се додава еднаков волумен тест-серум анти-A (ако работиме подгрупа A) или анти-B (ако работиме подгрупа B).

Чуваме по 5 капки од тест-серумите за натамошно титрирање. Епруветата со содржината се инкубира на собна температура, 2 часа. Потоа се центрифугира на 3 000 вртежи, 5 минути. Седиментот повторно се плакне 3 пати со физиолошки раствор и по последното плакнење, супернатантот се исфрла, а седиментот од еритроцитите се употребува за правење елуат. Во епрувета со седимент, во иста количина се капнува физиолошки раствор, се промешува, се инкубира во водена бања на 56°C, 10 минути. Веднаш потоа се центрифугира на 3 000 вртежи, 1 минута, и се одделува супернатантот, односно елуатот што служи за одредување на крвните подгрупи.

5.1.7.1.1. Определување на A крвна подгрупа

Претходно опишаната постапка продолжува по нормален или по скратен пат.

По нормален пат, потребно е најпрво да се титрира анти-A серумот, претходно употребен за апсорпцијата. Потоа, по апсорпцијата, се титрира супернатантот. Намалувањето на титарот во супернатантот укажува на крвна подгрупа. На крајот се титрира елуатот. Појавата на аглутинација во елуатот е потврда за присуство на крвна подгрупа.

Скратената постапка се изведува на следниов начин: во две епрувети обележани со број 1 и број 2 се капнува по 2 капки елуат. Во епруветата број 1 се капнува тест-еритроцити A (1 капка). Во епрувета број 2 се капнува тест-еритроцити O (1 капка). Епруветите се центрифугираат на 3 000 вртежи, 1 минута.

Толкување на резултатот: ако има аглутинација во епруветата обележана со број 1, тоа укажува на крвната подгрупа А. Јачината на аглутинацијата ја определува крвната подгрупа. Колку е послаба аглутинацијата, толку се однесува за поретка крвна подгрупа:

- ако нема аглутинација во епруветата обележана со број 1, се работи за О или В крвна група.

Епруветата број 2 ни служи како контрола и таа секогаш е негативна во однос на аглутинацијата.

5.1.7.1.2. Определување на АВ крвна подгрупа

Определувањето на крвната подгрупа од АВ, исто така, може да се изведе по нормална постапка и по скратена постапка.

По нормална постапка, потребно е најпрво да се титрира анти-А и анти-В серумот, претходно употребен за апсорпцијата. Потоа, по апсорпцијата, се титрираат супернатантите. Намалувањето на титарот во супернатантите укажува на крвна подгрупа. На крајот се титрираат елуатите. Појавата на аглутинација во елуатите е потврда за присуство на крвна подгрупа.

Скратената постапка се изведува на следниов начин: во три епрувети, обележани со број 1, 2, 3, се капнуваат по 2 капки елуат. Во епруветата број 1 се капнуваат тест-еритроцити А (1 капка). Во епруветата број 2 се капнуваат тест-еритроцити В (1 капка). Во епруветата број 3 се капнуваат тест-еритроцити О (1 капка). Се центрифугира на 3 000 вртежи, 1 минута.

Толкување на резултатот: ако има аглутинација во епруветата со број 1, се однесува на крвна подгрупа на антигенот А. Ако нема аглутинација во епруветата број 1, а има во епруветата обележана со број 2, тогаш се однесува за крвна подгрупа на антигенот В. Третата епрувета е контролна, нема аглутинација.

5.2. Податоци од направени анализи за определување крвна група (ABO-систем) и Rh-фактор на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје

Во периодот од јуни до ноември 2019 година, на Институтот за трансфузиска медицина – Скопје, обработени се 759 примероци од пациенти од СТМ при Ј.З.У. Специјална болница по гинекологија и акушерство „Мајка Тереза“ – Чаир. Кај сите примероци се одредени крвни групи и Rh-фактор. Застапеноста на крвните групи е различна и е изразена во табелата подолу (табела 6). Застапеноста на крвните групи кај овие 759 примероци, изразена во проценти, е прикажана во табела 7.

Табела 6: Застапеност на крвните групи и на Rh-факторот во испитаните 759 примероци од пациенти од СТМ при Ј.З.У. Специјална болница по гинекологија и акушерство „Мајка Тереза“ – Чаир

Месец	Примероци	Крвна група О	Крвна група А	Крвна група В	Крвна група АВ	Rh-позитивни	Rh-негативни
Јуни	131	46	43	32	10	116	15
Јули	128	45	56	17	10	114	14
Август	130	42	55	24	9	116	14
Септември	142	56	55	23	8	126	16
Октомври	103	40	43	17	3	95	8
Ноември	125	45	56	16	8	108	17
Вкупно	759	274	308	129	48	675	84

Табела 7: Процентуална застапеност на крвните групи и Rh-факторот во испитани 759 примероци од пациенти од СТМ при Ј.З.У. Специјална болница по гинекологија и акушерство „Мајка Тереза“ – Чаир

Месец	Примероци	Крвна група О	Крвна група А	Крвна група В	Крвна група АВ	Rh-позитивни	Rh-негативни
Јуни	131	35%	33%	24%	8%	89%	11%
Јули	128	35%	44%	13%	8%	89%	11%
Август	130	32%	42%	18%	7%	89%	11%
Септември	142	39%	39%	16%	6%	89%	11%
Октомври	103	39%	42%	17%	3%	92%	8%
Ноември	125	36%	45%	13%	6%	86%	14%
Вкупно	759	36%	41%	17%	6%	89%	11%

Резултатите од определувањето на крвните групи и на Rh-факторот со серолошки методи од испитаните 759 примероци ни потврдуваат дека најзастапена крвна група во Македонија, што е во согласност и со податоците за застапеноста на крвните групи во Европа, е крвната група А, и тоа кај 41% од испитаните примероци. Податоците од Европа покажуваат 40% застапеност на оваа крвна група во општата популација, а овој процент останува непроменет и од последните податоци од испитувањето направено во нашата држава во 2004 год., кои исто така изнесуваат 41%. На светско ниво, процентуалната застапеност на оваа крвна група е 29,41% (A^+ 27,42% и A^- 1,99%) што во споредба со 41% во Р. Македонија покажува повисока процентуална застапеност на оваа крвна група кај населението што живее во Европа. Потоа, според застапеноста, следува крвната група О, со 36% во испитуваните примероци, што е соодветно и на податоците за застапеност на оваа крвна група во општата популација со 34-35% во Европа, и претходните 35% во нашата држава (резултати од 2004 год., за општата популација). Во однос на светската популација (вкупно 41,22%, и тоа O^+ 38,67% и O^- 2,55%), крвната група О е застапена со нешто понизок процент во нашата држава. Во испитуваните примероци, поретко застапени се крвните групи В и АВ, со соодветно 17% и само 6% за крвната група АВ. И овие резултати се во согласност со податоците за застапеност на крвните групи во Европа и на светско ниво (табела 4 и 5). Во однос на Rh-факторот, најголем дел од испитаните

примероци се Rh^+ , и тоа 89%, а 11% се Rh^- . Овој резултат исто така е во согласност со податоците за распределеноста на Rh-факторот во општата популација во Европа, кои изнесуваат 85% за Rh^+ и 15% за Rh^- .

Што се однесува на примената на протоколите за анализа, за сите испитувани примероци користен е методот на хемаглутинација во гел-картички. Од сите анализирани примероци, само еден примерок се покажа како проблематичен во однос на определувањето на D-антигенот, па кај него е направено дополнително тестирање со примена на антихуманоглобулински тест во Кумбсова гел-картичка. Дополнителниот тест покажа дека овој примерок е D^u позитивен, односно има слаб D-антиген, со што се потврдува и податокот дека само <1% од населението во Македонија, како што е и во Европа, има слаб D-антиген.

6. ЗАКЛУЧОК

Обезбедувањето соодветни единици крв за пациентите што имаат ретки крвни групи или развиено клинички значајни антитела кон високофреквентните антигени е посебен предизвик за центрите за трансфузија.

Серолошките тестирања остануваат главен дел од работата во лабораториите за трансфузиска медицина.

За потврдување на резултатите кај проблематични примероци, секогаш е потребно да се изведе дополнителен тест, најдобро со примена на друг комплементарен метод.

Во денешно време, молекуларната типизација е непроценлив додаток на овие традиционални серолошки методи. Развојот на нови тестови за молекуларно генотипизирање напредува бргу и, истовремено, со намалување на цената по изведена анализа, овие тестови најверојатно ќе станат задолжителни, а не само опционални за крводарителите и за пациентите. Примената на крвни единици кај кои има молекуларно совпаѓање може да го намали ризикот од настанување на трансфузиски реакции, особено одложени реакции по трансфузија на постојни алоантитела или пак спречување на алоимунизација.

Пред да се прифати генотипизацијата како универзален стандард за сите предтрансфузиски тестирања на донатори, мора да се решат некои важни ограничувања, вклучително и фактот дека генотипот не секогаш го предвидува фенотипот. Потребни се нови клинички испитувања за да се одговори на важните прашања и потребна е детална база на податоци за донатори и пациенти.

Серолошката детекција и молекуларната типизација засега се надополнуваат во иста насока, но за да се одговори на предизвиците на индивидуализираната медицина, најдобро е да се воспостави план за работа со постепено воведување нови чекори во работата на центрите за трансфузија, каде што би се проширила употребата на молекуларна дијагностика.

7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

Avent N.D., Reid M.E. (2000). The Rh Blood group system: a review. *Blood*; 95(2): 375-387.

Chacon-Cortes D., Griffiths L. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, (2): 1-9.

Chang T.Y., Siegel D.L. (1998). Genetic and Immunological Properties of Phage-Displayed Human Anti-Rh(D) Antibodies: Implications for Rh(D) Epitope Topology. *Blood*, 91(8):3066-3078.

Cobianchi da Costa D., Pellegrino Jr. J., Guelsin G.A.S., Ribeiro K.A.R., Gilli S.C.O., Castilho L. (2013). Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 35(1): 35-38.

Denomme G.A., Fernandes B.J. (2007). Fetal blood group genotyping. *Transfuzion*; 47 (1 Supplement): 64S-68S.

Denomme G.A. (2013). Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion. *Br J Haematol*. 163(1): 3-9.

Flegel W.A. (2007). The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfus*; 5(2): 50-57.

Guzijan G., Milosavić M., Radojković Sredić D., Lilić M., Jukić B. (2019). Molecular typing of RhD-negative blood donors with C and/or E antigen. *Scr Med*;50(2):98-102.

Hillyer C.D., Shaz B.H., Winkler A.M., Reid M. (2008). Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services. *Transfus Med Rev*; 22(2): 117-132.

Jukić I., Bingulac-Popović J., Samardžija M., Lampalo M., Hećimović A., Dogić V., Strauss Patko M. (2017). Raspodjela glavnih alela sustava ABO krvnih grupa u hrvatskoj populaciji. *Acta Med Croatica*, 71:235-240.

Jungbauer C. (2009). Molecular basis and genotyping for rare blood types. Transfus Med Hemother., 36(3): 213-218.

Pavelić J. (2012). Otkrivene dvije nove krvne grupe. Medix; 18(100): 140-144.

Reid ME. (2009). Transfusion in the age of molecular diagnostics. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 171-177.

Rizzo C., Castiglia L., Arena E., Gandi S., Mazzola G., Caruso C., Vasto S. (2012). Weak D and partial D: our experience in daily activity. Blood Transfus; 10(2): 235-236.

Sapatnekar S. (2015). Molecular Typing for Red Blood Cell Antigens. Clinical Laboratory News. <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2015/march/molecular-typing-for-red-blood-cell-antigens%20>.

Учебници

1. Gligorović V., Balint B. Klinicka transfuziologija. Zavod za udzbenike I nastavna sredstva, Beograd, 1997.

2. Матевска Н., Грозданова А. Молекуларна биологија со генетика практична настава. Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје, 2010.

3. Џекова-Стојкова С., и соработници. БИОХЕМИЈА. Катедра по биохемија при Медицинскиот факултет – Скопје, НИП „Форум“, Скопје, 1999.

Прирачници

Стефановска В., Димитровски К. 101 ПРАШАЊЕ ЗА И ОКОЛУ ДАРУВАЊЕТО. Републички завод за трансфузиологија, Скопје, 2004.

Интернет-страници

www.diamed.com

www.pinterest.de

<https://www.inno-train.de/en/automationinstruments/endpoint-fluorescence-measurement-dna-quantification/>

РЕЦЕНЗИРАНИ И ОБЈАВЕНИ ТРУДОВИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО

Митревска Н., Серолошка детекција на еритроцитни антигени, Медикус, бр. 30, стр. 14, 2020.